

Preparation of immobilised acclimated micro-organisms, production method and use for preactivating interrupted fermentation processes

Patent number: FR2812655
Publication date: 2002-02-08
Inventor: DULAU LAURENT; FATIMA TEIXEIRA CARDOSO DE MAR; SANTOS LEONOR
Applicant: LALLEMAND SA (FR)
Classification:
- international: C12C11/09; C12G1/022; C12G3/02; C12N11/04; C12C11/00; C12G1/00; C12G3/02; C12N11/00; (IPC1-7): C12N11/10; C12C11/09; C12G1/022; C12G1/073; C12N11/10; C12R1/85
- european: C12C11/09; C12G1/02B; C12G3/02; C12N11/04
Application number: FR20000010319 20000804
Priority number(s): FR20000010319 20000804

Report a data error here

Abstract of FR2812655

The invention concerns a preparation of micro-organisms immobilised in beads acclimated to alcohol and/or acidity, and partly dried, capable of developing a fermenting activity when they are introduced in alcohol or acid musts. The invention also concerns a method for obtaining such a preparation comprising an acclimating step and an immobilising step for the micro-organisms, said steps being carried out in any sequence, but necessarily preceding a partial dehydrating step. The invention provides the advantages on enabling the micro-organisms to be preserved in viable and active form for several months, and to be used directly for reactivating interrupted fermenting processes, in particular alcoholic fermentation processes, for producing wine and other fermented beverages.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 812 655

②① N° d'enregistrement national : 00 10319

⑤① Int Cl⁷ : C 12 N 11/10, C 12 G 1/022, 1/073, C 12 C 11/09 //
(C 12 N 11/10, C 12 R 1:85)

①⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 04.08.00.

③⑩ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 08.02.02 Bulletin 02/06.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : LALLEMAND SA Société anonyme —
FR.

⑦② Inventeur(s) : DULAU LAURENT, FATIMA TEIXEIRA
CARDOSO DE MARIA et SANTOS LEONOR.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : LALLEMAND SA.

⑤④ PRÉPARATION DE MICRO-ORGANISMES ACCLIMATÉS IMMOBILISÉS DANS DES BILLES, PROCÉDE DE
PRODUCTION ET APPLICATION DE LADITE PRÉPARATION A LA RELANCE DE FERMENTATIONS
ARRÊTÉES.

⑤⑦ La présente invention a pour objet une préparation de
micro-organismes immobilisés dans des billes, acclimatés à
l'alcool et/ ou à l'acidité, et partiellement séchés de manière
à assurer une bonne conservation et une capacité à relan-
cer une fermentation arrêtée, sans étape longue et fasti-
dieuse d'acclimatation sur les lieux de l'utilisation.

L'invention a également pour objet un procédé de pro-
duction de ladite préparation, et son application à la relance
de fermentations arrêtées.

L'invention consiste essentiellement à immobiliser selon
un procédé connu, des micro-organismes dans une matrice
de polymères, à acclimater lesdits microorganismes avant
ou après leur immobilisation, puis à sécher partiellement la
matrice contenant lesdits micro-organismes.

Les avantages de la présente invention résident dans la
possibilité de conserver les micro-organismes sous forme
viable et active pendant plusieurs mois de stockage, et de
permettre une utilisation directe pour la relance des fer-
mentations arrêtées, particulièrement les fermentations alcool-
iques pour la production de vin ou autres boissons
fermentées.

FR 2 812 655 - A1



Description

La présente invention concerne une préparation de micro-organismes immobilisés dans des billes semi-humides pour assurer la reprise de fermentation de boissons fermentées.

Il est connu que les micro-organismes immobilisés peuvent servir à l'élaboration de boissons fermentées telles que le vin, la bière, le champagne, les boissons pétillantes à degré d'alcool variable.

Différents modes d'immobilisation de cellules sont connus, on peut citer en particulier :

La demande de brevet EP 0350374 A1 qui décrit la préparation de micro-organismes immobilisés dans des gels sensiblement déshydratés, dont l'utilisation est destinée à la préparation de boissons fermentées.

La demande de brevet EP 0173915 B1 qui décrit la préparation d'un biocatalyseur à cellules immobilisées dans un gel pour la fermentation et/ou la prise de mousse de vin champagnisé ou obtenu selon la méthode champenoise.

Le brevet FR 2570959 qui décrit la méthode d'obtention de billes contenant des micro-organismes employés pour la fermentation des boissons citées plus haut.

Les procédés décrits dans ces brevets sont utilisables pour préparer les microorganismes immobilisés dans des billes selon la présente invention. On utilise de préférence une matrice polymère en alginate de calcium et une levure *Saccharomyces cerevisiae*. On peut également utiliser par exemple des matrices de polyacrylamide, de pectate ou de carraghénane.

Le problème posé actuellement est de disposer d'un outil permettant la relance d'une fermentation arrêtée sans étapes fastidieuses d'acclimatation des microorganismes. En effet, après arrêt accidentel d'une fermentation en cours, l'addition de ferments, par exemple de levure dans le cas des fermentations alcooliques, pour relancer la fermentation nécessite une étape dite d'acclimatation desdits microorganismes aux conditions du milieu de fermentation (concentration d'alcool et/ou d'acide déjà produit) ; à défaut d'une telle étape, les microorganismes non acclimatés subissent un stress qui provoque généralement la perte de leur viabilité, et donc l'échec de la tentative de relance de fermentation. Les techniques actuellement utilisées font donc appel :

-soit à des microorganismes sous forme sèche qui sont réhydratés puis progressivement acclimatés dans des milieux de concentration en alcool et/ou d'acidité croissante, et ce juste avant leur utilisation,

-soit des microorganismes préalablement acclimatés en dehors du lieu d'utilisation; dans ce dernier cas ils sont transportés et utilisés sous forme humide, dans un délai bref de quelques jours, leur durée de conservation étant faible.

Le séchage de microorganismes, qui permet généralement une bonne
5 conservation, n'est pas applicable aux microorganismes acclimatés, levures notamment, car il provoque dans ce cas une mortalité importante et rapide.

Il a été trouvé de façon surprenante que l'immobilisation de microorganismes acclimatés dans des billes de polymères, puis le séchage ménagé et partiel de ces billes permettait à la fois une bonne viabilité desdits microorganismes et le maintien de leur
10 capacité à relancer une fermentation arrêtée, et ce même après un stockage prolongé de plusieurs mois. C'est cette technique qui fait l'objet de la présente invention. Selon un autre aspect de l'invention, les microorganismes peuvent être immobilisés dans les billes avant d'être acclimatés, puis finalement séchés.

On décrira le procédé d'obtention de billes partiellement séchées, enrobant les
15 micro-organismes sélectionnés et acclimatés à l'alcool, puis le procédé de réhydratation des micro-organismes immobilisés dans les billes et l'application directe desdits microorganismes, sans étape d'acclimation, à la relance de fermentations arrêtées.

On réalise au départ une culture de micro-organismes dans un milieu de culture classique. Selon un aspect particulier de l'invention, les microorganismes sont
20 acclimatés, avant d'être immobilisés dans une matrice de polymère, par exemple d'alginate, selon un procédé connu. Selon un autre aspect de l'invention, on réalise l'étape d'acclimation sur les microorganismes préalablement immobilisés. La matrice, divisée sous forme de billes, est ensuite partiellement déshydratée pour obtenir des billes d'aspect sec, mais contenant une petite proportion d'humidité de manière à maintenir la
25 viabilité des microorganismes.

On appellera "billes" des particules de forme sphérique ou de toute autre forme, obtenues par fractionnement de la matrice de polymère incluant les microorganismes. Selon une des caractéristiques de la présente invention, la taille moyenne de ces particules est comprise entre 0,1 et 5mm, de préférence entre 1 et 3mm.

30 Selon une autre caractéristique de l'invention, la proportion de microorganismes par rapport au polymère est comprise entre 1 et 50%, de préférence entre 5 et 20% en poids sec.

Selon une autre caractéristique de l'invention, l'activité de l'eau A_w des billes après séchage ménagé est comprise entre 0,1 et 0,5, de préférence entre 0,3 et 0,4.

35 Selon une autre caractéristique de l'invention, on réalise le séchage ménagé des billes contenant les micro-organismes, par une technique de lyophilisation, de lit fluidisé ou d'étuvage.

Selon une autre caractéristique de l'invention, on conserve les billes contenant les micro-organismes, partiellement déshydratés, dans un emballage étanche à la vapeur d'eau, qui est de préférence maintenu à une température relativement basse, de préférence d'environ 4°C. Dans ces conditions on obtient une excellente conservation
5 des microorganismes pendant plusieurs mois de stockage

Selon un aspect particulier de l'invention, les micro-organismes sont des levures, en particulier du genre *Saccharomyces*.

D'autres applications, caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la lumière des exemples non limitatifs ci-après.

10

Exemple 1: préparation de billes d'alginate semi-humides contenant des levures *Saccharomyces cerevisiae*, immobilisées préalablement acclimatées à l'alcool

Les billes sont préparées à partir d'une solution d'alginate de sodium, polymère linéaire extrait d'algues et composé d'acide α -D-manuronique et α -L-guluronique. Les
15 levures préalablement acclimatées à l'alcool, sont ensuite ajoutées à cette solution dans une cuve. Dans cet exemple la souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* L43 commercialisée sous la marque Lalvin® est utilisée.

Cette solution passe ensuite, grâce à un système de tubes, dans un système de vibration qui permet la formation de gouttes.

20 Ces gouttes sont ensuite gélifiées au contact d'une solution 0,2 M de chlorure de calcium. Le temps de contact est de 30 minutes.

Les billes ainsi formées sont lavées par immersion pendant 10 minutes dans de l'eau dés ionisée.

Les billes sont ensuite séchées partiellement sur lit fluidisé. Cette étape permet
25 d'obtenir une activité en eau A_w comprise entre 0.3 et 0.4. La température de séchage est inférieure ou égale à 40°C. Le diamètre des billes obtenues est de 2 à 4 mm. Après les contrôles qualité les levures sont emballées et stockées à 4°C avant utilisation.

Exemple 2: stabilité des levures au cours du stockage

30 Afin d'estimer l'activité de billes, contenant la souche de levure *Saccharomyces cerevisiae*, après conservation de 6 mois à 4°C, le contrôle suivant est réalisé :

- 30 grammes de billes préparées selon l'exemple 1 ci-dessus sont placées dans une solution de glucose à 50 g/l (volume 100 ml) à 37°C.
- La solution est maintenue à 37°C et l'évolution de la concentration du sucre est suivi
35 au cours du temps.
- Après 2 heures la concentration de sucre est inférieure à 2 g/l ce qui correspond à la fin de la fermentation.

Le même contrôle est réalisé au temps 0 (juste après la production des billes) et après 6 mois de stockage à 4°C. La fin de la fermentation est obtenue après le même temps d'incubation de 2 heures. Les levures immobilisées préparées selon l'exemple 1 sont donc stables pendant au moins 6 mois de stockage à 4°C.

5

Exemple 3 : Application au vin blanc

On procède à la reprise de fermentation en utilisant la levure Lalvin® L43 immobilisée sous forme de billes conditionnées en unité de 5kgs.

10 La dose d'utilisation est de 200 g de billes par hl de vin.

Le vin blanc utilisé dans cet exemple est un vin de Sauvignon présentant les caractéristiques suivantes :

- degré alcool acquis au moment de l'inoculation avec les billes : 12°75
- sucres résiduels : 14,64 g/l

15

Pour les besoins de l'essai, le vin en arrêt de fermentation est réparti en deux bonbonnes de 25 l (modalités 1 et 2) et deux cuves de 150 hl (modalités 3 et 4).

Ces modalités sont les suivantes (la température est régulée entre 18 et 20°C) :

20

1. témoin négatif : vin nonensemencé
2. témoin positif : vinensemencé par des levures Lalvin® L43, sous forme de levure sèche, à la dose de 20 g/hl, réhydratées, non acclimatées
3. vinensemencé avec des levures Lalvin® L43, sous forme de levure sèche, à la dose de 20 g/hl, réhydratées, acclimatées à l'alcool selon le protocole I.T.V. connu par l'homme de l'art (durée des phases de réhydratation et d'acclimatation : 7 jours)
- 25 4. vinensemencé avec des levures Lalvin® L43 immobilisées préparées selon le protocole décrit ci après.

30

La modalité de préparation des levures immobilisées est la suivante :

a) 30 kg de billes sont ajoutés, à la température de 37°C, à une solution de 60 l d'eau contenant 600 g de glucose / fructose (50/50) et 480 g de NaCl.

b) Après 30 minutes, les sacs sont retirés et trempés, dans les mêmes conditions dans une nouvelle solution, identique à la précédente.

35

c) ensuite les sacs sont immergés dans la cuve dont la fermentation alcoolique doit être relancée.

On suit, pour chaque modalité, l'évolution du taux de sucre en fonction du temps.
Les résultats de ce suivi sont présentés dans le tableau suivant :

	Modalité 1	Modalité 2	Modalité 3	Modalité 4
Jours	Sucres résiduels (g/l)	Sucres résiduels (g/l)	Sucres résiduels (g/l)	Sucres résiduels (g/l)
0	14,64	14,64	14,64	14,64
1				13,66
4				12,5
5				12,1
7	14,64	14,67	14,64	
9			12,46	
10				8,88
11			10,54	8
14	16,62	14,64	8,66	5,71
17				4,34
20			5,55	2,48
22	14,65	14,60	3,07	
24				1,88
26	14,64	14,62	2	

- 5 On remarque que le procédé selon la présente invention permet d'obtenir un achèvement de la fermentation, au bout d'une durée plus courte que celle observée avec les mêmes levures acclimatées selon la méthode habituelle, toutes choses étant égales par ailleurs.

On n'observe pas, dans l'un et l'autre cas d'augmentation de l'acidité volatile.

- 10 Le procédé d'application de la présente invention :

- permet une économie de temps de 2 jours pour la durée totale de l'opération,
- demande 1 heure de préparation et non plus 7 jours de préparation et de suivi du pied de cuve.

Exemple 4 : Application au vin rouge

On procède à la reprise de fermentation en utilisant la levure Lalvin® L2226 immobilisée sous forme de billes conditionnées en unité de 5kgs.

La dose d'utilisation est de 200 g de billes par hl de vin.

5 Le vin rouge utilisé dans cet exemple est un vin de cépage Merlot présentant les caractéristiques suivantes :

- degré alcool acquis au moment de l'inoculation avec les billes : 99,9 g éthanol/l
- sucres résiduels : 19, 29 g/l

10

Pour les besoins de l'essai, le vin en arrêt de fermentation est réparti en deux bonbonnes de 25 l (modalités 1 et 2) et deux cuves de 5 hl (modalités 3 et 4).

Ces modalités sont les suivantes (la température est régulée entre 20 et 25°C) :

15

1. témoin négatif : vin nonensemencé,
2. témoin positif : vinensemencé par des levures Lalvin® L2226, sous forme de levure sèche, à la dose de 20 g/hl, réhydratées, non acclimatées
3. vinensemencé avec des levures Lalvin® L2226, sous forme de levure sèche, à la dose de 20 g/hl, réhydratées, acclimatées à l'alcool selon le
- 20 protocole I.T.V. connu par l'homme de l'art (durée des phases de réhydratation et d'acclimatation : 6 jours)
4. vinensemencé avec des levures Lalvin® L2226 immobilisées et préparées selon le protocole décrit ci-après.

25

La modalité de préparation des levures immobilisées est la suivante :

- a) 1 kg de billes sont ajoutés, à la température de 37°C, à une solution de 2 l d'eau contenant 20 g de glucose / fructose (50/50) et 16 g de NaCl.
- b) Après 30 minutes, les sacs sont retirés et trempés, dans les mêmes conditions dans une nouvelle solution identique à la précédente.
- 30 c) ensuite les sacs sont immergés dans la cuve dont la fermentation alcoolique doit être relancée.

On suit, pour chaque modalité, l'évolution du taux de sucre en fonction du temps. Les résultats de ce suivi sont présentés dans le tableaux suivant :

35

	Modalité 1		Modalité 2		Modalité 3		Modalité 4	
Jours	Sucres Résiduels (g/l)	Ethanol (g/l)	Sucres résiduels (g/l)	Ethanol (g/l)	Sucres résiduels (g/l)	Ethanol (g/l)	Sucres résiduels (g/l)	Ethanol (g/l)
0	19,3	99,9	19,3	99,9	19,3	99,9	19,3	99,9
2	Inchangé	Inchangé	Inchangé	Inchangé	Inchangé	Inchangé	18,87	101,48
4	Inchangé	Inchangé	Inchangé	Inchangé	Inchangé	Inchangé	16,9	101,93
5	Inchangé	Inchangé	Inchangé	Inchangé	Inchangé	Inchangé	14,38	102,36
6	Inchangé	Inchangé	Inchangé	Inchangé	Inchangé	Inchangé	13,73	102,37
7	Inchangé	Inchangé	Inchangé	Inchangé	19,29	100,66		
11	Inchangé	Inchangé	Inchangé	Inchangé	16,93	101,35	4,2	104,86
12	Inchangé	Inchangé	Inchangé	Inchangé	11,63	102,41	2,76	105,29
13	Inchangé	Inchangé	Inchangé	Inchangé	7,46	103,53	2,21	105,31
14	Inchangé	Inchangé	Inchangé	Inchangé	3,81	104,91		
15	Inchangé	Inchangé	Inchangé	Inchangé	1,83	105,39		

On remarque que le procédé selon la présente invention permet d'obtenir un achèvement de la fermentation, au bout d'une durée inférieure à celle observée avec les mêmes levures acclimatées selon la méthode habituelle, toutes choses étant égales par ailleurs.

On n'observe pas, dans l'un et l'autre cas de montée de l'acidité volatile.

Le procédé d'application de la présente invention :

1. permet un gain de 2 jours pour la durée totale de l'opération,
2. demande 1 heure de préparation, au lieu de 6 jours de préparation et de suivi du pied de cuve

Essai 5 : Application à l'hydromel

On procède à la reprise de fermentation en utilisant la levure Lalvin® EC1118 immobilisée dans des billes d'alginate de Ca^{2+} conditionnées dans une unité de 200 g.

La dose d'utilisation est de 200 g de billes pour 100 l d'hydromel.

L'hydromel utilisé dans cet exemple était issu d'un mélange 300 g de miel / 1 litre d'eau, le but étant de fabriquer de l'hydromel doux titrant 12,5 % d'alcool. Au moment de l'arrêt de fermentation il possédait les caractéristiques suivantes :

- degré alcool acquis au moment de l'inoculation avec les billes : 10,5 % d'alcool
- sucres résiduels totaux : 87,5 g/l
- sucres résiduels à fermenter : 34 g/l

Pour les besoins de l'essai, l'hydromel en arrêt de fermentation est réparti en deux bonbonnes de 50 l (modalités 1 et 2).

- 5 Ces modalités sont les suivantes (la température est régulée entre 20 et 25°C) :
1. hydromel ensemencé avec la levure EC1118 immobilisées et préparées selon le protocole décrit ci-après.
 2. hydromel ensemencé avec la levure EC1118, sous forme de levure sèche, à la dose de 20 g/hl, réhydratées, acclimatées à l'alcool selon le protocole I.T.V.
 - 10 adapté à l'hydromel (durée des phases de réhydratation et d'acclimatation : 4 jours)

La modalité de préparation des levures immobilisées est la suivante :

- a) 200 g de billes sont ajoutés, à la température de 37°C, à une solution de 400 ml
- 15 d'eau contenant 4 g de glucose / fructose (50/50) et 3,2 g de NaCl.
- b) Puis après 30 minutes, le sac est retiré et trempé, dans les mêmes conditions dans une nouvelle solution identique à la précédente.
- c) ensuite le sac est immergé dans la cuve dont la fermentation alcoolique doit être relancée.

20

On suit, pour chaque modalité, l'évolution du taux de sucre en fonction du temps. Les résultats de ce suivi sont présentés dans le tableaux suivant :

	Modalité 1	Modalité 2
Jours	Sucres résiduels (g/l)	Sucres résiduels (g/l)
0	87,50	87,50
1	86,00	85,00
4	75,00	72,50
5	71,50	68,50
7	66,20	64,00
9	58,50	59,50
11	50,00	54,70
14	36,70	46,00
20	36,50	36,20

On remarque que le procédé selon la présente invention permet d'obtenir un achèvement de la fermentation, au bout d'une durée inférieure à celle observée avec les mêmes levures acclimatées selon la méthode habituelle, toutes choses étant égales par ailleurs.

5

Le procédé d'application de la présente invention :

1. permet un gain de quasi 6 jours pour la durée totale de l'opération,
2. demande 1 heure de préparation, au lieu de 4 jours de préparation et de suivi du pied de cuve

REVENDECATIONS

1. Préparation de microorganismes vivants immobilisés dans des billes de polymères partiellement déshydratées, caractérisée en ce que lesdits microorganismes
5 sont, préalablement à la déshydratation, acclimatés à l'alcool et/ou à l'acidité.
2. Préparation selon la revendication 1 caractérisée en ce que les billes sont composées d'une matrice de polysaccharide, de préférence un gel d'alginate.
3. Préparation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la taille moyenne des billes est comprise entre 0,1 et 5mm, de préférence entre 1 et 3mm.
- 10 4. Préparation selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisée en ce que la proportion de microorganismes par rapport au polymère est comprise entre 1 et 50%, de préférence entre 5 et 20% en poids sec.
5. Préparation selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisée en ce que l'activité de l'eau A_w des billes après déshydratation est comprise entre 0,1 et 0,5, de
15 préférence entre 0,3 et 0,4.
6. Préparation selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisée en ce que les microorganismes sont des levures, de préférence du genre *Saccharomyces*.
7. Procédé de préparation de microorganismes vivants immobilisés dans des billes de polymères partiellement déshydratées, caractérisé en ce que les
20 microorganismes sont soumis, préalablement à l'étape de déshydratation, à une étape d'acclimatation à l'alcool et/ou à l'acidité.
8. Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce que le polymère utilisé pour l'immobilisation des microorganismes est un polysaccharide, de préférence de l'alginate.
- 25 9. Procédé selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisé en ce que les microorganismes utilisés sont des levures, de préférence du genre *Saccharomyces*.
10. Procédé selon l'une des revendications 7 à 9, caractérisé en ce que la proportion de microorganismes par rapport au polymère est comprise entre 1 et 50%, de préférence entre 5 et 20% en poids sec.
- 30 11. Procédé selon l'une des revendications 7 à 10, caractérisé en ce que la déshydratation des billes est effectuée par lyophilisation, lit fluidisé ou séchage, et est limitée de façon à obtenir une activité en eau A_w comprise entre 0,1 et 0,5, de préférence entre 0,3 et 0,4.
12. Préparation susceptible d'être obtenue selon l'une quelconque des
35 revendications 7 à 11.
13. Application d'une préparation selon l'une des revendications 1 à 6, ou selon la revendication 12, pour la reprise de fermentations arrêtées.

14. Application selon la revendication 13, caractérisée en ce que la fermentation est une fermentation alcoolique.



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2812655

N° d'enregistrement
national

FA 590917
FR 0010319

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
D,A	EP 0 350 374 A (MOET & CHANDON) 10 janvier 1990 (1990-01-10) * colonne 4, ligne 4 - ligne 13 * * colonne 4, ligne 51 - ligne 56 * * colonne 7, ligne 21 - ligne 44 * * colonne 10; exemples V-VI *	1-12	C12N11/10 C12G1/022 C12G1/073 C12C11/09
A	US 4 380 552 A (GESTRELIUS STINA M ET AL) 19 avril 1983 (1983-04-19) * colonne 2, ligne 36 - ligne 40 * * colonne 4, ligne 1 - ligne 2 * * colonne 6, ligne 61 - ligne 64 * * colonne 8; exemple 5 *	1-4,7,8, 10,12	
A	WO 92 14544 A (MOET & CHANDON) 3 septembre 1992 (1992-09-03)		
A	US 5 070 019 A (HILL FRANK) 3 décembre 1991 (1991-12-03)		
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
			C12N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
3 mai 2001		Blanco Urgoiti, B	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.